

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03666

研究課題名(和文)パターン化人工膜を用いた広範な膜タンパク質のラフト親和性と機能の解析

研究課題名(英文) Evaluating the affinity of membrane proteins and lipid raft using a patterned model membrane platform

研究代表者

森垣 憲一 (Morigaki, Kenichi)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：10358179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜の微小ドメイン構造(ラフト)は、膜タンパク質の機能調節に重要な役割を果たすと考えられている。本研究は、パターン化人工膜を用いて膜タンパク質のラフト親和性を解析するため、大量発現・精製が難しい哺乳類膜タンパク質を、細胞膜小胞を用いて細胞から人工膜に導入する技術を開発した。精神疾患に関わるGPCRドーパミン受容体(DRD2)を含む膜小胞を形成し人工膜に導入した。PDMSと基板との間に形成されるナノ空間において人工膜に多くのDRD2分子が2次元拡散していることが確認された。この技術を発展させることにより、人工膜を用いて多様な哺乳類膜タンパク質の機能を解析することが可能になるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は、細胞内においてシグナル伝達など重要な機能を担い、疾患などにも深く関与しているため、医薬品の重要な標的になっている。膜タンパク質の機能は脂質膜の組成や分布にも影響を受けていると考えられるが、生体膜内における機能制御機構を生きた細胞を用いて詳細に検証することは非常に困難である。本研究により、哺乳類膜タンパク質を細胞から人工膜に導入する技術が開発され、その機能解析に道が開けた。この成果は、膜タンパク質の機能を分子レベルで定量的に評価することを可能にし、疾患メカニズムの解明、医薬品開発にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Model biological membranes are useful tools to study the functions of membrane proteins. We developed a strategy to directly reconstitute mammalian membrane proteins from the cell membrane blebs into a model biological membrane to bypass the technically challenging solubilization and purification processes. We expressed GPCR and GPI-AP in CHO cells and produced blebs by chemical induction. By rupturing blebs on the substrate surface, we could form a planar bilayer and observe single molecules of GPCR and GPI-AP. Furthermore, many reconstituted molecules were observed in a nanometric cleft between the substrate and a PDMS elastomer sheet. This methodology should enable to evaluate the physicochemical properties and functions for a wide range of mammalian membrane proteins.

研究分野：生物物理学

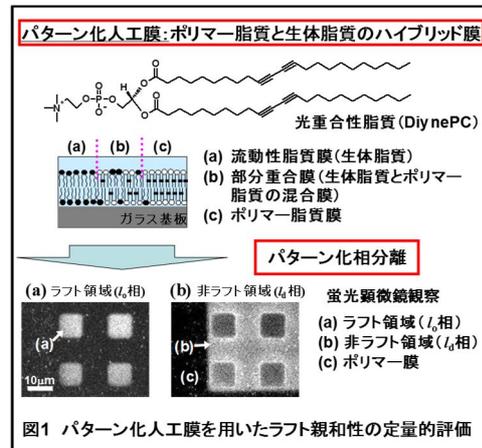
キーワード：生体膜 ラフト 受容体 人工膜 蛍光顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

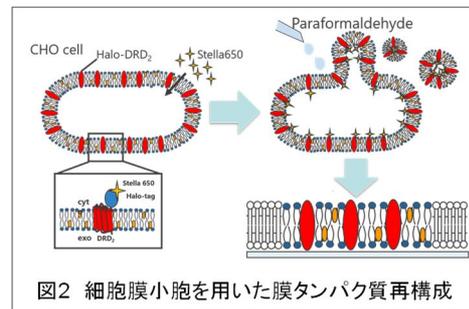
細胞膜において、コレステロールと飽和脂質に富んだ微小ドメイン構造(ラフト)は、膜タンパク質の局在や機能調節に大きな役割を果たすと考えられている[1]。多様な信号を受容する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) も、その機能にラフトが関わると考えられている[2]。しかし、ラフトの微小さと動的変化のため、ラフトが機能調節に果たす役割は未解明である。

我々は、生体膜のモデル系として、安定なポリマー脂質膜と、生体膜の特性を保持する生体脂質膜を、ガラス基板表面でハイブリッド化したパターン化人工膜を開発した(図1)[3]。そして、生体膜のラフト領域(秩序液晶相: lo 相)と非ラフト領域(無秩序液晶相: ld 相)が相分離した人工膜に膜タンパク質(ロドプシン光受容体: Rh)を再構成して、lo 相・ld 相への分配から Rh のラフト親和性を定量的に評価することに成功した[4]。しかし、ヒトを含む哺乳類の細胞において重要な機能をつかさどる多くの膜タンパク質(GPCR、GPI アンカー型タンパク質(GPI-AP)など)は、大量発現・精製が難しいため、これまで、人工膜に再構成してラフト親和性を定量することが困難であった。



2. 研究の目的

本研究は、パターン化人工膜を用いて幅広い膜タンパク質とラフトとの相互作用を定量的に評価する手法を開発することを目的とした。ヒトを含む哺乳類の細胞において重要な機能をつかさどる多くの膜タンパク質は、大量発現・精製が難しいため、これまで、人工膜に再構成してラフト親和性を定量することが困難であった。この問題を解決するために、細胞膜を薬剤処理することで得られる膜小胞(blebs)を人工膜に直接導入することで、哺乳類細胞の膜タンパク質のラフト親和性を定量できる技術の開発を目指した(図2)。



一般に、細胞膜を人工膜に導入することは困難であるとされてきた。しかし、膜融合促進剤や界面活性剤を用いることで、細胞由来の膜小胞を人工膜に組み込むことが可能であるとの報告が近年なされている[5]。また、我々は近年、パターン化人工膜と高分子エラストマー(PDMS)を接合して、厚さが100nm以下のナノ空間を形成する技術を開発した[6]。細胞膜小胞を用いて広範な膜タンパク質を人工膜に再構成することができれば、ナノ空間において膜タンパク質を超高感度で計測してラフトによる機能調節を解析する、新しい方法論を開発することにつながると思われる。

3. 研究の方法

(1) パターン化ポリマー膜

パターン化ポリマー膜の作製には、光重合性脂質である 1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycerol-3-phosphocholine (DiynePC) を用いた。この脂質は紫外光により重合するジアセチレン脂質であり、SPB を作製し紫外光を照射すると脂質分子が架橋され安定なポリマー化脂質膜が形成される[7]。DiynePC モノマーを基板表面に吸着させ、パターンが施されたフォトマスクを用いて紫外光照射することで、任意のパターンを有するポリマー膜が作製できる。界面活性剤を処理することにより脂質が取り除かれた部分には新たに脂質二分子膜を導入することが可能である。

(2) 細胞膜小胞の作製

CHO 細胞に、精神疾患に関わる GPCR ドーパミン受容体 (DRD2) を、細胞質側に Halo タグをつけた状態で発現させた。そして、Halo タグに特異的に結合できる蛍光色素誘導体 (Stella650-Halo) を細胞に加え、Stella650 を DRD2 に共有結合させた。次に、細胞に対してホルムアルデヒド-ジチオスレイトール処理を施し、細胞膜表面から膜小胞を発生させた。回収した細胞膜小胞を遠心かけ、溶液置換・濃縮を行い、大きさが約 100nm の細胞膜小胞を得ることができた。導入される DRD2 の配向性を検証するためには、CHO 細胞に Halo タグの付いた DRD2 を発現し、Halo タグに特異的に結合できるビオチンリガンドを共有結合した。

(3) 細胞膜小胞を用いた再構成

高分子エラストマー (polydimethylsiloxane: PDMS) シートに直径 3 mm の穴を開けて、ポリマー化脂質膜を表面に持つガラス基板に接着することで再構成用のセルを作製した。セルに緩衝液 (PBS (pH 7.4)) を導入し、さらに DRD2 を含む細胞膜小胞を添加した。基板表面に吸着しなかった細胞膜小胞を PBS でリンスしたのち、膜融合を促進するためにリン脂質 (1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) , 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-5000] (PEG5000-PE))より形成されるベシクルを添加した。

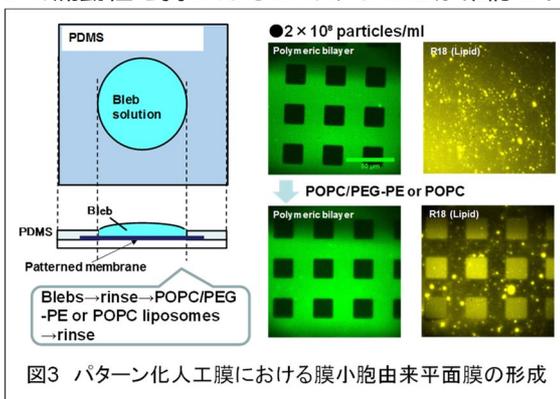
(4) DRD2 の蛍光顕微鏡観察

導入された DRD2 の観察は、蛍光顕微鏡 (Olympus IX73)を用いて行った。励起光源としてキセノンランプ (UXL-75XB, Olympus) を用い、撮影は CMOS カメラ (Orca 4.0, Hamamatsu Photonics) により行った。ポリマー化脂質膜および流動性脂質膜は緑色蛍光 (励起: 470-490 nm・蛍光: 510-550 nm) で観察し、DRD2 は赤色蛍光 (励起: 630-650 nm・蛍光: 670-720 nm) で観察した。撮影した画像は、Image-J, Fiji, Matlab を用いて解析した。

4. 研究成果

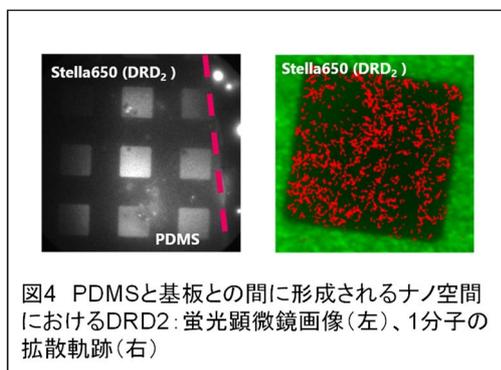
(1) 細胞膜小胞を用いた再構成:

パターン化人工膜への膜タンパク質再構成は、巨視的な水溶液と接する膜系と、ナノ空間に閉じ込められた膜系で異なる挙動がみられた。まず、巨視的な水溶液と接する膜系では、細胞膜小胞の粒子が低密度である場合 ($\sim 10^8$ particles/ml 以下) 細胞膜小胞を基板表面に吸着させたのちに、融合促進用ベシクル (POPC もしくは POPC/PEG-PE (0.5mol%)) を導入することで細胞膜小胞の不安定化が誘起され平面膜が形成された。このことは、細胞膜小胞にあらかじめ脂溶性蛍光色素を入れて観察することで可視化できた (図 3)。融合促進用ベシクル導入前には細胞膜小胞が顆粒状のまま基板表面に吸着しているのが観察された。融合促進用ベシクル導入後にはパターンの区画内に蛍光が均一にみられた。局所的に蛍光を褪色させると時間とともに蛍光が回復することが観察され、脂質二分子膜が連続して流動性を持ったものであることが確認された。そして、DRD2 分子が側方拡散することも 1 分子蛍光観察により確認された。一方、細胞膜小胞の粒子が高密度である場合 ($\sim 10^9$ particles/ml 以上) 細胞膜小胞を基板表面に吸着させたのちに融合促進用ベシクルを導入しても平面膜は形成されなかった。これは、ガラス基板表面における細胞膜小胞密度が高すぎるために、ベシクルが平面膜断片を形成して融合を誘起できなかったためと推測される。巨視的な水溶液と接する膜系では、再構成された DRD2 の密度が極めて低いという問題点があった。



(2) PDMS と基板との間に形成されるナノ空間:

巨視的な水溶液と接する膜系とは対照的に、PDMS と基板との間に形成されるナノ空間においては、高密度の DRD2 を再構成することができた。細胞膜小胞の粒子が高密度である場合 ($\sim 10^9$ particles/ml 以上) でも細胞膜小胞を導入後、ナノ空間内においてパターン人工膜の区画部分に高密度の DRD2 が拡散していることが観察された (図 4)。このような平面膜の形成と DRD2 の再構成は、融合促進用ベシクルを加えずに細胞膜小胞のみで存在する条件でも観察されたため、巨視的な水溶液と接する膜系とは全く異なるメカニズムで膜形成が起きているものと推定される。PDMS と基板との間に形成されるナノ空間において平面膜が形成されるメカニズムは現時点では不明である。この現象は、PDMS と基板とが完全に接合している部分や、PDMS と基板との間に大きな間隙 (マイクロメートル以上) がある場合には観察されなかった。したがって、ナノ空間における局所的な膜集積と不安定化が関与しているものと推定される。



(3) 再構成された膜タンパク質の配向性:

巨視的な水溶液と接する膜系とナノ空間に閉じ込められた膜系において再構成された DRD2 分子について、その配向を確認した。そのために、Halo タグにビオチンリガンドを結合した DRD2 を用いた。細胞膜小胞をパターン化人工膜に導入したのちに、蛍光標識ストレプトアビジン (Streptavidin-AlexaFluor594 (SAF594)) を導入した。細胞膜小胞は原則、細胞と同様の配向

性を持っていると考えられる。Halo タグは細胞質側にあるため、SAF594 の結合が見られる場合は、DRD2 の細胞質側が水溶液に向けて配向していることになる。巨視的な水溶液と接する膜系においては、SAF594 の導入前後で蛍光値の変化はなかった。一方、ナノ空間に閉じ込められた膜系においては SAF594 導入後、パターンの区画内に蛍光が均一に光っているのが確認された(図5)。また、蛍光を一部褪色後、回復していることから流動性の確認もできた。このことから、巨視的な水溶液と接する膜系とナノ空間に閉じ込められた膜系において DRD2 の配向性が異なり、平面膜形成機序が異なることが示唆された。

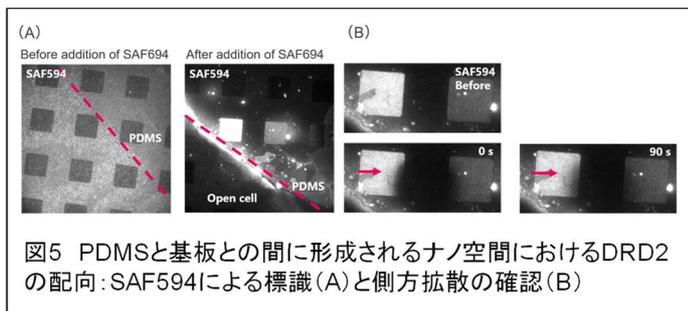


図5 PDMSと基板との間に形成されるナノ空間におけるDRD2の配向:SAF594による標識(A)と側方拡散の確認(B)

(4) 考察および今後の展望

本研究は、パターン化人工膜を用いて膜タンパク質のラフト親和性を解析するため、大量発現・精製が難しい哺乳類膜タンパク質を、細胞膜小胞を用いて細胞から人工膜に導入する技術を開発した。PDMS と基板との間に形成されるナノ空間において人工膜に多くの DRD2 分子導入されたことは、これまでに知られていない新規現象である。PDMS と基板とが完全に接合している部分や、PDMS と基板との間に大きな間隙(マイクロメートル以上)がある場合においては DRD2 導入は観察されなかった。したがって、ナノ空間における局所的な膜集積と不安定化が関与しているものと推定される。今後、PDMS と基板との間隙をナノメートルレベルで正確に制御することで、局所的な膜集積と不安定化のメカニズムを解明してゆきたい。この技術を進展させることにより、人工膜を用いて多様な哺乳類膜タンパク質の機能を高感度かつ定量的に解析することが可能になるものと期待される。細胞に目的の膜タンパク質を発現し、細胞膜小胞を作製することで、可溶化、精製工程なしで再構成を行うことができる。また、パターン化人工膜の脂質組成は自由に変えることができるため、膜タンパク質に対する脂質の影響を詳細に調べることができる。この成果は、膜タンパク質の機能を分子レベルで理解することを可能にし、疾患メカニズムの解明、医薬品開発にも貢献できるものと考えられる。

<引用文献>

1. Lingwood, D., Simons, K. "Lipid rafts as a membrane-organizing principle", *Science* **327** 46-50, (2010)
2. Zheng, H., Pearsall, E. A., Hurst, D., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., Reggio, P. H., Loh, H. H., Law, P. Y. "Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize μ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling", *BMC Cell Biol.* **13** 6, (2012)
3. Okazaki, T., Morigaki, K., Taguchi, T. "Phospholipid vesicle fusion on micropatterned polymeric bilayer substrates", *Biophys. J.* **91** 1757-1766, (2006)
4. Tanimoto, Y., Okada, K., Hayashi, F., Morigaki, K. "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", *Biophys. J.* **109** (11), 2307-2316, (2015)
5. Richards, M. J., Hsia, C.-Y., Singh, R. R., Haider, H., Kumpf, J., Kawate, T., Daniel, S. "Membrane protein mobility and orientation preserved in supported bilayers created directly from cell plasma membrane blebs", *Langmuir* **32** 2963-2974, (2016)
6. Ando, K., Tanabe, M., Morigaki, K. "Nanometric gap structure with fluid lipid bilayer for the selective transport and detection of biological molecules", *Langmuir* **32** (31), 7958-7964, (2016)
7. Morigaki, K., Baumgart, T., Jonas, U., Offenhäusser, A., Knoll, W. "Photopolymerization of diacetylene lipid bilayers and its application to the construction of micropatterned biomimetic membranes", *Langmuir* **18** 4082-4089, (2002)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 24件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanabe Masashi, Ando Koji, Komatsu Ryota, Morigaki Kenichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Nanofluidic Biosensor Created by Bonding Patterned Model Cell Membrane and Silicone Elastomer with Silica Nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1802804 ~ 1802804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201802804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morigaki Kenichi, Tanimoto Yasushi	4. 巻 1860
2. 論文標題 Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 2012 ~ 2017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toru Mitsu-Ura, Hideki Shirakawa, Kenichi G. N. Suzuki, Akitoshi Miyamoto, Kotomi Sugiura, Takayuki Michikawa, Akihiro Kusumi, Katsuhiko Mikoshiba	4. 巻 9
2. 論文標題 Dual-FRET imaging of IP3 and Ca2+ revealed Ca2+-induced IP3 production maintains long lasting Ca2+ oscillations in fertilized mouse eggs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40931-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Kenichi G. N., Ando Hiromune, Komura Naoko, Fujiwara Takahiro, Kiso Makoto, Kusumi Akihiro	4. 巻 1104
2. 論文標題 Unraveling of Lipid Raft Organization in Cell Plasma Membranes by Single-Molecule Imaging of Ganglioside Probes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-2158-0_3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Masanao, Suzuki Kenichi G.N., Murata Michio, Matsumori Nobuaki	4. 巻 215
2. 論文標題 Evidence of lipid rafts based on the partition and dynamic behavior of sphingomyelins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 84 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2018.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoyama Taka A., Watanabe Yusuke, Goto Junri, Naito Kazuma, Kasai Rinshi S., Suzuki Kenichi G. N., Fujiwara Takahiro K., Kusumi Akihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 497 ~ 506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0032-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Rinshi S., Ito Shuichi V., Awane Ryo M., Fujiwara Takahiro K., Kusumi Akihiro	4. 巻 76
2. 論文標題 The Class-A GPCR Dopamine D2 Receptor Forms Transient Dimers Stabilized by Agonists: Detection by Single-Molecule Tracking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12013-017-0829-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Toshiki, Tamura Fuyuko, Kobayashi Sawako, Tanimoto Yasushi, Hayashi Fumio, Sudo Yuki, Iwasaki Yasuhiko, Morigaki Kenichi	4. 巻 33
2. 論文標題 Hybrid Model Membrane Combining Micropatterned Lipid Bilayer and Hydrophilic Polymer Brush	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5752 ~ 5759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.7b00463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Kaoru, Tanimoto Yasushi, Hayashi Fumio, Harada Erisa, Shan Xiao-Yuan, Shionyu Masafumi, Hijikata Atsushi, Shirai Tsuyoshi, Morigaki Kenichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 56
2. 論文標題 The Role of the Prod1 Membrane Anchor in Newt Limb Regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 270 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/anie.201609703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seno Keiji, Hayashi Fumio	4. 巻 292
2. 論文標題 Palmitoylation is a prerequisite for dimerization-dependent raftophilicity of rhodopsin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15321 ~ 15328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.804880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Yoko, Ueno Satoko, Morita Mitsuhiro, Hayashi Fumio, Maekawa Shohei	4. 巻 673
2. 論文標題 Inhibitory effect of several sphingolipid metabolites on calcineurin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 132 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Masanao, Suzuki Kenichi G.N., Matsumori Nobuaki, Takada Misa, Ano Hikaru, Morigaki Kenichi, Abe Mitsuhiro, Makino Asami, Kobayashi Toshihide, Hirotsawa Koichiro M., Fujiwara Takahiro K., Kusumi Akihiro, Murata Michio	4. 巻 216
2. 論文標題 Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201607086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kenichi G.N., Ando Hiromune, Komura Naoko, Fujiwara Takahiro K., Kiso Makoto, Kusumi Akihiro	4. 巻 1861
2. 論文標題 Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 2494 ~ 2506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2017.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komura Naoko, Suzuki Kenichi G.N., Ando Hiromune, Konishi Miku, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kusumi Akihiro, Kiso Makoto	4. 巻 597
2. 論文標題 Syntheses of Fluorescent Gangliosides for the Studies of Raft Domains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2017.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tiwari Sachin S., Shirai Yuki M., Nemoto Yuri L., Kojima Kumiko, Suzuki Kenichi G.N.	4. 巻 29
2. 論文標題 Native prion protein homodimers are destabilized by oligomeric amyloid 1-42 species as shown by single-molecule imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 106 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000000916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kenichi G.N., Ando Hiromune, Komura Naoko, Konishi Miku, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kiso Makoto, Fujiwara Takahiro K., Kusumi Akihiro	4. 巻 598
2. 論文標題 Revealing the Raft Domain Organization in the Plasma Membrane by Single-Molecule Imaging of Fluorescent Ganglioside Analogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2017.06.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Yuri L., Morris Roger J., Hijikata Hiroko, Tsunoyama Taka A., Shibata Akihiro C. E., Kasai Rinshi S., Kusumi Akihiro, Fujiwara Takahiro K.	4. 巻 75
2. 論文標題 Dynamic Meso-Scale Anchorage of GPI-Anchored Receptors in the Plasma Membrane: Prion Protein vs. Thy1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 399 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12013-017-0808-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makino Asami, Abe Mitsuhiro, Ishitsuka Reiko, Murate Motohide, Kishimoto Takuma, Sakai Shota, Hullin-Matsuda Fransoise, Shimada Yukiko, Inaba Takehiko, Miyatake Hideyuki, Tanaka Hideko, Kurahashi Atsushi, Pack Chan-Gi, Kasai Rinshi S. et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201500075R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Kaoru, Yamaguchi Toshiyuki, Mori Shoko, Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimanouchi Toshinori, Tanimoto Yasushi, Morigaki Kenichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 117
2. 論文標題 Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 99 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Fumio, Saito Natsumi, Tanimoto Yasushi, Okada Keisuke, Morigaki Kenichi, Seno Keiji, Maekawa Shohei	4. 巻 2
2. 論文標題 Raftophilic rhodopsin-clusters offer stochastic platforms for G protein signalling in retinal discs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0459-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MORIGAKI Kenichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Patterned Model Membrane for the Functional Studies of the Biological Membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 188 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Fuyuko, Tanimoto Yasushi, Nagai Rurika, Hayashi Fumio, Morigaki Kenichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Self-Spreading of Phospholipid Bilayer in a Patterned Framework of Polymeric Bilayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 14696 ~ 14703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b02685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件 (うち招待講演 33件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 Kenichi Morigaki
2. 発表標題 Patterned model membrane on the solid substrate
3. 学会等名 Bioelectrochemistry and more...2018, AIT/CEST Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Morigaki
2. 発表標題 Reconstituting Membrane Proteins in a Patterned Model Membrane
3. 学会等名 Workshop on Proteins in Artificial Membranes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Morigaki, Yasushi Tanimoto, Hayato Yamashita, Akinori Awazu, Fumio Hayashi
2. 発表標題 Raftophilicity and aggregation of membrane proteins in the photo-transduction
3. 学会等名 第56回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森垣憲一
2. 発表標題 人工生体膜とナノ空間を用いた生体分子計測技術の開発
3. 学会等名 量子ビームによるナノ構造形成とその医療・バイオ応用技術調査専門委員会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Morigaki
2. 発表標題 Development of complex and functional model membranes on solid substrate
3. 学会等名 International Symposium on Science and Technology of Molecular Assemblies for Biomaterials Innovation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森垣憲一
2. 発表標題 生体分子のインクジェット塗布におけるトレハロースの効果
3. 学会等名 第22回トレハロースシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Morigaki
2. 発表標題 Model biological membrane on the solid substrate: Potentials for biophysical studies and biomedical applications
3. 学会等名 Biochemistry and Cell & Developmental Biology Seminar Series at Weill Cornell Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Morigaki, Fuyuko Tamura, Yasushi Tanimoto, Rurika Nagai, Misato Yamada, Fumio Hayashi
2. 発表標題 Self-spreading of a phospholipid bilayer in the scaffold of polymerized lipid bilayer
3. 学会等名 257th ACS National Meeting and Exposition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 高精度1分子観察によるラフト組織化と機能の解明
3. 学会等名 第66回脳の医学・生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Suzuki
2. 発表標題 Regulation mechanisms of EGFR activity by gangliosides as revealed by single-molecule imaging
3. 学会等名 JAACT2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Suzuki
2. 発表標題 Regulation mechanisms of EGFR activity by ganglioside homodimer rafts as revealed by single-molecule imaging
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 高精度1分子観察によるラフト組織化とシグナル制御機構の解明
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 細胞膜の組織化と機能：高精度1分子観察による解明
3. 学会等名 第19回運動器科学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai R. S.
2. 発表標題 Transient dimer formation of G-protein coupled receptor: single fluorescent molecule imaging in live cells
3. 学会等名 The 3rd Biosignal Research Center International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠井倫志
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体の動的なダイマー形成：蛍光1分子観察法による解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第184回例会 若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai RS, Fujiwara TK, Kusumi A
2. 発表標題 Transient dimers of GPCRs are responsible for triggering GPCRs' basic constitutive signals - A finding by the two-color single fluorescent-molecule tracking in living cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting: Single Biomolecules（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai R. S.
2. 発表標題 Spontaneous activation in a transient GPCR dimer before ligation as revealed by dual-channel single fluorescent molecule imaging
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morigaki, K., Nishimura, T., Tamura, F., Kobayashi, S., Tanimoto, Y., Sudo, Y., Hayashi, F., Iwasaki, K.
2. 発表標題 Hybrid model membrane combining micropatterned lipid bilayer and hydrophilic polymer brush
3. 学会等名 253rd American Chemical Society National Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森垣憲一
2. 発表標題 人工膜を用いた膜シグナル伝達機構の再構成と定量的解析
3. 学会等名 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IX」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K.
2. 発表標題 Micropatterned model membrane to elucidate the functional roles of lipid micro-domains in the signal transduction cascade
3. 学会等名 Tethmem 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K.
2. 発表標題 Model membrane on a solid substrate: Crawling to grow from 2D into 3D structures
3. 学会等名 BioNano summer school 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K.
2. 発表標題 Model membrane on the solid substrates with increased complexity and functions
3. 学会等名 International Symposium on Science and Technology of Molecular Assemblies for Biomaterials Innovation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K.
2. 発表標題 Patterned lipid bilayer on solid substrate as a versatile model system of biological membrane
3. 学会等名 3rd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K., Tanimoto, Y., Kojima, S., Awazu, A., Hayashi, F.
2. 発表標題 Reconstitution and quantitative analyses of membrane signal transduction by using micropatterned model system
3. 学会等名 ConBio 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morigaki, K.
2. 発表標題 Patterned model biological membrane on the solid substrate
3. 学会等名 9th International Workshop on Nanostructures and Nanoelectronics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morigaki, K., Tanabe, M., Komatsu, R., Ando, K.
2. 発表標題 Nanometric gap structure for selective biosensing created with patterned lipid bilayer, silicone elastomer, and silica nanoparticles
3. 学会等名 255th American Chemical Society National Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 1分子観察によるラフト組織化と機能の解明
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー-生体膜の生物化学(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 1分子観察で明らかになったガングリオシドクラスター形成とそのEGF受容体活性制御機構
3. 学会等名 ConBio2017(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 細胞膜の組織化と機能:高精度1分子法による解明
3. 学会等名 名古屋大 IGER セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 高精度1分子イメージングで明らかになったラフト組織化と機能
3. 学会等名 第10回セラミド研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Unraveling of raft organization and function by single-molecule imaging
3. 学会等名 International seminar on biophysics and chemical biology of biomembranes and lipid bilayers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 細胞膜上での超高速1分子蛍光観察法
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 1分子観察で明らかになったガングリオシドのクラスター形成機構とEGF受容体活性制御機構
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kasai RS, Inoue A, Fujiwara TK, Kusumi A
2. 発表標題 -arrestin independent mechanism is involved in the temporal trapping of diffusing GPCR on cell surface
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学バイオシグナル総合研究センター環境物質応答部門
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/rceg-nowstone/index.html>
神戸大学（森垣憲一）
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~morigaki/>
岐阜大学 細胞生物物理学研究室（鈴木健一）
<https://www1.gifu-u.ac.jp/~single/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 文夫 (Hayashi Fumio) (80093524)	神戸大学・理学研究科・名誉教授 (14501)	
研究分担者	鈴木 健一 (Suzuki Kenichi) (50423059)	岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授 (13701)	
研究分担者	笠井 倫志 (Kasai Rinshi) (20447949)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教 (14301)	